

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
9. Jg., S. 398—401, September 1971

## Zur Reaktion von $\beta$ -Propiolacton mit Serumproteinen und Aminosäurederivaten

Von H. DETERMANN und H.-U. JOACHIM<sup>1)</sup>

*Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt/Main*

(Eingegangen am 13. April 1971)

Bei der Kälte-Sterilisierung von frischem Humanserum mit  $\beta$ -Propiolacton werden lediglich 7% des eingesetzten Reagenz an die Serumproteine gebunden. Fehlt dem Serum die Hydrolaseaktivität, so können bis zu 40% mit dem Eiweiß reagieren. Die Bindung erfolgt in erster Linie sowohl durch Acylierung als auch Alkylierung im Imidazolring des Histidins und durch Alkylierung der Mercaptangruppe des Cysteins sowie in zweiter Linie durch Acylierung der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins. Alle anderen funktionellen Gruppen der Eiweißstoffe reagieren nur sehr viel langsamer.

### *The reaction of $\beta$ -propiolactone with serum proteins and amino acid derivatives*

In the cold sterilisation of fresh human serum with  $\beta$ -propiolactone, only 7% of the added reagent is bound to the serum proteins. If the hydrolase activity is absent from the serum, up to 40% of the reagent can react with the protein. The binding is primarily due to acylation and alkylation in the imidazole ring of the histidine and alkylation of the mercaptan group of the cysteine, with a secondary contribution from the acylation of the  $\epsilon$ -amino group of the lysine. All the other functional groups of the proteins react only very much more slowly.

Nach G. A. LOGRIPPO läßt sich durch kombinierte  $\beta$ -Propiolactonbehandlung und UV-Bestrahlung hepatitis-sicheres Serum herstellen. Hierbei behalten die Serumproteine ihre elektrophoretischen und immunologischen Eigenschaften bei (1). Setzt man jedoch mit dem Adsorptionsmittel Aerosil behandeltes Serum oder solches, dem der Komplexbildner EDTA zugesetzt war, einer analogen Behandlung aus, verändern sich die elektrophoretischen und immunologischen Eigenschaften der Proteine signifikant. W. STEPHAN nimmt an, daß eine „ $\beta$ -Propiolacton-Hydrolase-Aktivität“ im normalen Serum für eine rasche Hydrolyse des  $\beta$ -Propiolactons Sorge trägt. Dadurch kommt es nur zu einer relativ geringen Modifizierung der Proteine (2). Nach Adsorption mit Aerosil oder Zusatz von EDTA fehlt die Hydrolyseaktivität im Serum.

Tritium-markiertes  $\beta$ -Propiolacton eignet sich sehr gut zur quantitativen Verfolgung der Reaktion. Durch zusätzliche Modellversuche mit Aminosäurederivaten sollte überdies eine Aussage über die Angriffsstelle des  $\beta$ -Propiolacton im Protein möglich sein.

### Modifizierung der Serumproteine durch $\beta$ -Propiolacton-[<sup>3</sup>H]

Von großem Interesse bei der kalten Sterilisierung von Blutserum ist die Frage nach der Menge  $\beta$ -Propiolacton, die — unvermeidlich — auch mit dem Protein reagiert. Das bisher übliche Verfahren festzustellen, wieviel  $\beta$ -Propiolacton nicht hydrolysiert, bestand darin, die Hydrolyse über einen Autotitrator zu verfolgen und aus dem Hydroxylionenverbrauch die hydrolysierte Menge zu berechnen. Die Differenz der hydrolysierten zur eingesetzten Menge  $\beta$ -Propiolacton sollte dann mit

dem Protein reagiert haben. Die Genauigkeit dieses Verfahrens ist wegen der Pufferwirkung der Serumproteine nicht sehr hoch.

Ein wesentlich genaueres Resultat bei der Bestimmung des Modifizierungsgrades der Serumproteine versprachen wir uns durch die Verwendung von tritiiertem  $\beta$ -Propiolacton. Mit der Messung der Radioaktivität der von niedermolekularen Bestandteilen separierten Proteine wird die absolute Menge  $\beta$ -Propiolacton an ihnen einfach bestimmbar. Die hohe Empfindlichkeit der radioaktiven Zählmethoden erlaubt für die vorliegende Untersuchung ein Arbeiten mit geringen Konzentrationen. Wir benutzten ein Gemisch aus normalem und radioaktiv markiertem  $\beta$ -Propiolacton. Dem nicht radioaktiven Trägermaterial wurde so viel tritiiertes  $\beta$ -Propiolacton zugesetzt, daß die für die Modifizierung benötigte Menge  $\beta$ -Propiolacton (0,3% w/w) dann etwa 0,05 mC enthielt. Diese Radioaktivität ist ausreichend zur Messung innerhalb der verschiedenen durchgeführten Untersuchungen und liegt wesentlich unter der Freigrenze für dieses Isotop.

Der Modifizierungsgrad wurde bestimmt an Serum, das analog der Vorschrift von LOGRIPPO in Abwesenheit (SM) und in Gegenwart von EDTA (EDTA-SM) mit markiertem  $\beta$ -Propiolacton der angegebenen Radioaktivität umgesetzt wurde. Aus beiden Ansätzen wurden gleich große Proben entnommen, die durch Gelfiltration an Sephadex G-25 in ihre hoch- und niedermolekularen Bestandteile zerlegt wurden (3). Die Fraktionen wurden mittels Biuret-Reaktion auf ihren Proteingehalt und im Flüssigkeitsszintillationszähler auf ihre Radioaktivität hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 und 2 dargestellt.

Durch neuerliches Zählen der Impulse eines jeweils aliquoten Teils der vereinigten Fraktionen läßt sich die Gesamtradioaktivität der einzelnen Peaks und der rela-

<sup>1)</sup> Aus der Dissertation von H.-U. JOACHIM, Universität Frankfurt/Main D 30.

tive Anteil der hochmolekularen Fraktion bestimmen (Tab. 1).

Im normalen LoGRIPPO-Verfahren werden also nur 7,2% des eingesetzten  $\beta$ -Propiolacton an die hochmolekularen Bestandteile des Serums gebunden, wohingegen bei Anwesenheit von EDTA — also bei Hemmung der Hydrolase (2) — fast das sechsfache davon mit dem Protein reagiert. Der jeweilige Rest hydrolysiert zu den verschiedenen Propionsäurederivaten (4).

Tab. 1  
Gesamtradioaktivität (Imp./Min.) der an Sephadex G-25 erhaltenen Peaks

	ohne	mit EDTA
hochmolekular	307 150	1 683 350
niedermolekular	3 974 900	2 472 950
relativer Anteil der hochmolekularen Fraktion (% $\beta$ -Propiolacton)	7,2	40,5

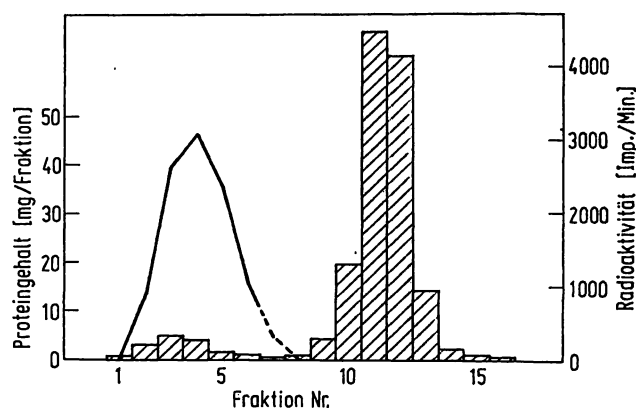


Abb. 1

Gelfiltration von 2 ml Humanserum nach Behandlung mit  $\beta$ -Propiolacton- $^{[3]}\text{H}$  entsprechend LoGRIPPO (1). Die schraffierten Säulen zeigen die Radioaktivität der an Sephadex G-25 ( $V_t = 30$  ml) erhaltenen Fraktionen (1,5 ml). Die ausgezogene Linie gibt den Proteingehalt der Fraktionen an

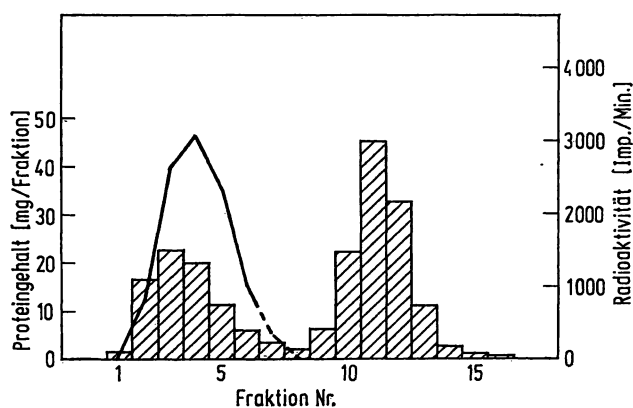


Abb. 2

Gelfiltration von 2 ml Humanserum nach Behandlung mit  $\beta$ -Propiolacton- $^{[3]}\text{H}$  entsprechend LoGRIPPO (1), aber in Gegenwart von EDTA (3 mg/ml). Die Bedingungen entsprechen denen von Abb. 1

### Die Rolle des Lysins

Die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins wird für viele Reaktionen der Proteine mit chemischen Agentien verantwortlich gemacht (5). Die Verwendung von  $\beta$ -Propiolacton- $^{[3]}\text{H}$  in Verbindung mit der Gelchromatographie ermöglicht eine Entscheidung darüber, ob dies hier ebenso gilt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit studierten wir diesen

Vorgang an einem isolierten Protein, an Humanalbumin. Wir behandelten einmal natives Humanalbumin, zum anderen erschöpfend amidiniertes Humanalbumin mit  $\beta$ -Propiolacton- $^{[3]}\text{H}$ . Die Amidinierung sollte als Schutz für die  $\epsilon$ -Aminogruppen im Protein dienen (6). Nach der Modifizierung mit  $\beta$ -Propiolacton- $^{[3]}\text{H}$  wurde wie oben jeweils an Sephadex G-25 getrennt, die am Protein gebundene Menge Radioaktivität gemessen und daraus die Menge  $\beta$ -Propiolacton berechnet, die mit Protein reagiert hatte:

1 Mol natives Albumin hatte mit 22 Molen  $\beta$ -Propiolacton reagiert, während 1 Mol amidiniertes Albumin mit 16,6 Mol  $\beta$ -Propiolacton umgesetzt war. Berücksichtigt man, daß bei amidiniertem Albumin von den insgesamt 56 Molen Lysin/Mol Albumin die etwa 40% zugänglichen Reste besetzt sind, dann zeigt der geringe Unterschied von nur 4 Molen Protein-gebundenem  $\beta$ -Propiolacton, daß die Hauptmenge nicht mit den Lysin-Seitenketten reagiert hat.

### Umsetzung von Aminosäure-Seitenketten mit $\beta$ -Propiolacton

Die Erkenntnis, daß wenigstens 75% des an das Protein gebundenen  $\beta$ -Propiolacton mit anderen Gruppen als den freien Aminogruppen reagiert hatte, veranlaßte uns, neben Lysin weitere Aminosäuren mit funktionellen Gruppen gesondert auf ihre Reaktivität mit  $\beta$ -Propiolacton hin zu untersuchen. Bei diesen Untersuchungen mußte Sorge getragen werden, die im Proteinverband geschützte  $\alpha$ -Aminogruppe der Aminosäuren im Laborversuch ebenfalls der Reaktion mit  $\beta$ -Propiolacton zu entziehen. Das geschah über die Carbobenzoxym-Schutzgruppe. Die Carboxylgruppe benötigte keinen Schutz, da unter den vorliegenden Bedingungen keine Reaktion mit  $\beta$ -Propiolacton festzustellen ist. Den im Proteinverband vorkommenden funktionellen Gruppen entsprachen bei der Untersuchung folgende Aminosäuren:

Gruppe	Aminosäure
Amino-	Lysin
Hydroxy-	Serin, Tyrosin
Mercapto-	Cystein
Imino-	Histidin, Tryptophan
Guanido-	Arginin

Der gespannte Lactonring des  $\beta$ -Propiolacton kann sich prinzipiell sowohl am Acyl- als auch am Alkylkohlenstoff öffnen und die entsprechenden Derivate bilden (2). Als Kriterium dafür, ob mit unseren Aminosäuren Acylierung oder Alkylierung eingetreten war, unterwarfen wir die elektrophoretisch isolierten Derivate der Hydrolyse mit Säure. Trat nach der Hydrolyse des isolierten Umsatzproduktes die zugrunde liegende Aminosäure erneut im Pherogramm auf, schlossen wir auf Acylierung. Alkylierung wurde für den Fall konstatiert, daß das Reaktionsprodukt sich säurestabil, also uneingedrückt von der Hydrolyse mit Säure zeigte und erneut als solches im Pherogramm zu identifizieren war. Am Beispiel der Reaktionsmöglichkeiten der  $\epsilon$ -Aminogruppe

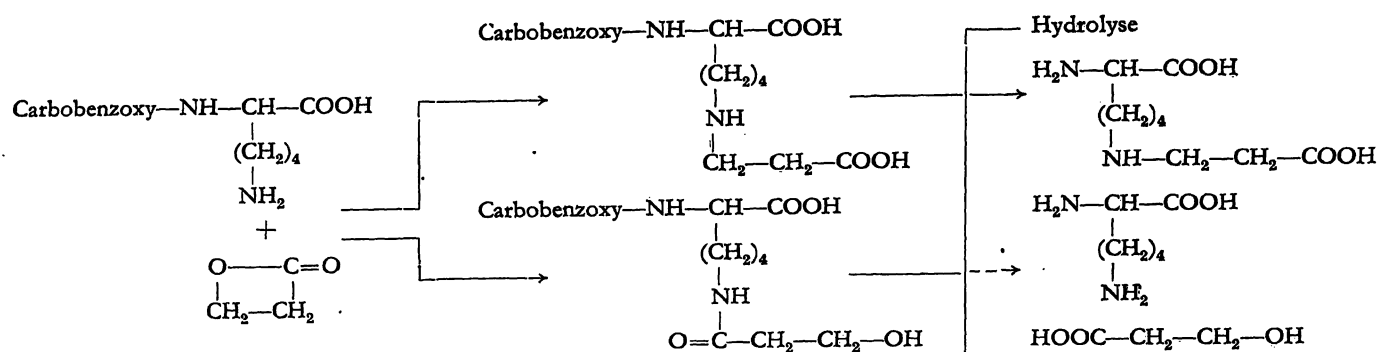


Abb. 3

Hydrolyse mit Säure als Kriterium für Alkylierung oder Acylierung dargestellt am Beispiel von Lysin

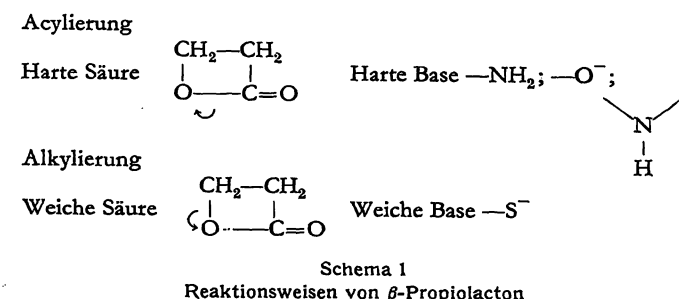
Tab. 2

Reaktion der Aminosäurederivate mit  $\beta$ -Propiolacton. (Säurelabil = das Produkt übersteht die Totalhydrolyse nicht, sondern liefert die entsprechende Aminosäure, Säurestabil = das Produkt wird durch die Totalhydrolyse nicht verändert)

Aminosäure	Mole $\beta$ -Propiolacton	labil	Säure-stabil
Lysin	1	+	
Serin	10		+
Tyrosin	10	+	
Arginin	10		+
Tryptophan	10	+	+
Histidin	1	+	+
Cystein	1		+

von Lysin mit  $\beta$ -Propiolacton ist in Abbildung 3 das Prinzip schematisch dargestellt. Die Reaktion der N $\alpha$ -geschützten Aminosäuren mit  $\beta$ -Propiolacton ließen wir unter angenähert physiologischen Bedingungen bei pH 8,0 im wäßr. Milieu stattfinden. Hierbei war es notwendig, die 1–10fache äquimolare Menge an  $\beta$ -Propiolacton (also sehr viel mehr als im normalen LoGRIPPO-Verfahren) zur Reaktion zu bringen, um wenigstens papierelektrophoretisch isolierbare Reaktionsprodukte zu erhalten. Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

Eine erste Deutung dieser Ergebnisse gelang mit dem von PEARSON entwickelten Konzept der weichen und harten Säuren und Basen (7). Hierbei betrachten wir beim  $\beta$ -Propiolacton den Acylkohlenstoff als harte und den Alkylkohlenstoff als vergleichsweise weiche Säure (8). Berücksichtigt man ferner die Eigenschaften der zur Reaktion gelangenden Basen, ergibt sich als Deutungsmöglichkeit Schema 1.

Schema 1  
Reaktionsweisen von  $\beta$ -Propiolacton

Bei Histidin und Tryptophan als Base sind die zwei unterschiedlichen Reaktionsprodukte wohl auf ein Überlappen des harten und des weichen Prinzips zurückzu-

führen. Die Acylierung scheint bedingt durch den wenig polarisierbaren Iminstickstoff, wohingegen bei der Alkylierung das jeweilige weiche  $\pi$ -Elektronensystem in Rechnung gestellt werden muß.

Aus den Modellversuchen geht also hervor, daß sich  $\beta$ -Propiolacton mit den Seitenketten von Lysin und Tyrosin unter Acylierung, mit Cystein unter Alkylierung und mit Histidin und Tryptophan nach beiden Reaktionsweisen umsetzt; mit Serin und Arginin reagiert  $\beta$ -Propiolacton unter den angewandten Bedingungen nicht.

## Beschreibung der Versuche

### Vorbereitung der markierten Charge $\beta$ -Propiolacton-[ $^3\text{H}$ ]

Wir gingen aus von 25 mC Radioaktivität. Sie wurde uns geliefert als ätherische Lösung eines tritiierten Propiolactons mit der spezifischen Radioaktivität von 100–200 mC/mMol  $\beta$ -Propiolacton. (The Radiochemical Centre Amersham, Batch No B 12 (–20).) Diese Lösung wurde mit 5 ml absol. Äther versetzt, gut vermischt, in 5 Portionen von je 5 mC geteilt und bei +5° gelagert. Eine Portion wurde mit 5 ml „kaltem“  $\beta$ -Propiolacton versetzt und der Äther mit vorgetrocknetem Stickstoff vertrieben. Wir erhielten so ein Präparat, das in den bei unseren Modifizierungen angewendeten 0,053 ml/20 ml Serum etwa 0,05 mC enthielt. Mit diesem  $\beta$ -Propiolacton wurden alle Modifizierungen durchgeführt.

### Flüssigkeitsszintillationszählung

#### Szintillatorlösung:

60 g Naphthalin  
375 g 1,4-Di-[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzol = (POPOP)  
2 g 2,5 Diphenyl-oxazol (PPO)  
werden in 500 ml reinstem Dioxan gelöst.

10 ml dieser Lösung werden in der Meßküvette mit 1 ml Proteinlösung versetzt. Wegen der begrenzten Löslichkeit der Proteine darf die Proteinlösung nicht konzentrierter sein als maximal 0,1 mg/ml. Gemessen wurde im automatischen Flüssigkeitsszintillationszähler Tricarb (Hewlett/Packard).

### LoGRIPPO-Verfahren (1)

20 ml Blutserum wurde bei 5° mit 0,053 ml (0,06 g)  $\beta$ -Propiolacton versetzt und 1 Std. gerührt. Durch Zugabe von 1N NaOH wird der pH-Wert konstant auf 8 gehalten. Nach der Stunde noch vorhandenes  $\beta$ -Propiolacton läßt man dann bei 37° und konstantem pH 8 aushydrolysieren.

Bei der  $\beta$ -Propiolacton-Behandlung in Gegenwart von EDTA werden, bevor man nach dem normalen LoGRIPPO-Verfahren modifiziert, 0,032 g Titriplex III (Firma Merck, Darmstadt) in den 20 ml Serum gelöst. Das verwendete  $\beta$ -Propiolacton wurde bei –20° gelagert und war frisch destilliert.

*Modifizierung von Albumin und amidiniertem Albumin mit  $\beta$ -Propiolacton-[ $^3\text{H}$ ]*

Uns lag eine 2,74proz. amidinierte Humanalbuminlösung in physiologischer NaCl-Lösung vor. (Sie wurde uns freundlicherweise von Dr. W. STEPHAN — Biotest Frankfurt — zur Verfügung gestellt.) Eine native Humanalbuminlösung gleicher Konzentration wurde in 0,9proz. NaCl-Lösung angesetzt. Von beiden Lösungen wurden 20 ml mit 0,053 ml tritiiertem  $\beta$ -Propiolacton analog der obigen Vorschrift modifiziert.

*Reaktionen der  $\text{N}^\alpha$ -geschützten Aminosäuren mit  $\beta$ -Propiolacton*

Die  $\text{N}^\alpha$ -geschützte Aminosäure (0,005M) wurde in so wenig Wasser wie möglich gelöst (15—50 ml). Im Fall von Tryptophan

waren wir gezwungen, als Lösungsmittel Methanol (1 ml) zuzusetzen. Diese Lösung wurde mit 0,5N NaOH auf pH 8 eingestellt, mit  $\beta$ -Propiolacton (Tab. 2) versetzt und gerührt. Während der Reaktion sank der pH-Wert der Lösung signifikant ab, da durch Hydrolyse von  $\beta$ -Propiolacton Propionsäurederivate entstanden. Wir mußten auf pH-Konstanz achten, die durch ein pH-Meter und durch synchrone Zugabe von 0,5N NaOH zum Reaktionsprodukt erreicht wurde. Nach Beendigung der Reaktion wurden aus der Reaktionslösung direkt Proben für die analytische und präparative Papierelektrophorese entnommen.

Wir danken der Firma Biotest-Serum-Institut GmbH, Frankfurt für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit. Herrn Dr. W. STEPHAN, Biotest, danken wir für anregende Diskussionen.

### Literatur

1. LOGRIPPO, G. A., Ann. N. Y. Acad. Sc. 83, 587 (1960). —
2. STEPHAN, W. und L. RÓKA, diese Z. 6, 186 (1968). —
3. DETERMANN, H., Gelchromatographie, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1957). —
4. KELLY, A. R., F. W. HARTMANN und C. E. RUPE, in Hepatitis p. 387 Frontiers, Boston (1957). —
5. COHEN, L. A., Annual Rev. Biochem. 37, 683 (1968). —
6. WOFSY, L. und S. J. SINGER, Biochemistry, USA 2, 104 (1963). —
7. PEARSON, R. G., J. Amer. chem. Soc. 85, 3533 (1963). —
8. SAVILLE, B., Angew. Chem. 79, 966 (1957).

Prof. Dr. phil. nat. H. Determann  
6 Frankfurt (Main) — Niederrad  
Schwarzwaldstr. 144